

Részletes zárójelentés

1. A munkaterv kibővített célkitűzése

Munkánk az Alzheimer kór állatkísérletes kutatásaihoz kapcsolódik. Központi helyet foglal el ezen kutatásokban a humán amyloid prekursor fejrje (hAPP). Jóllehet a molekula és azok fragmensei egészséges agyvelőben is számos fontos funkciót töltenek be a szinaptikus transzmisszióban és plaszticitásban vagy a szignáltraszdukcióban, metabolizmusának zavara az Alzheimer kórra jellemző megnövekedett béta-amiloid fragmens szinthez és következményes plakklerakódáshoz vezet. Ez a folyamat az agyszövet súlyos megbetegedését eredményezi.

Eredeti munkatervünkben azt kívántuk vizsgálni, milyen hatással van a plakkokba lerakódó beta-amyloid magas szintje a neokortikális principális sejtek morfológiájára valamint az inter-neuronális kapcsolatokra. Ezen kísérleteinket transzgenikus egértörzs (Tg2576) egyedein végeztük, melyek magas szinten expresszálnak egy mutáns hAPP-t, ami a szolubilis beta-amiloid frakció emelkedéséhez és az Alzheimer kórra jellemző következményes plakklerakódáshoz vezet az agyszövetben (Hsiao et al. 1996). Ezzel párhuzamosan, munkatervünket kibővítve, hasonló vizsgálatokat indítottunk annak feltérképezésére, milyen hatással van az élettani hAPP expresszió a piramissejtek morfológiájára és szinaptikus kapcsolataira. Ezekhez a kísérletekhez egy másik transzgenikus egértörzs (B6-Py8.9) egyedeit használtuk, ezen állatok agyszövetében a neuronok vad típusú humán APP-t expresszálnak az endogén egér APP-vel hasonló mennyiségben (Lamb et al. 1993), plakklerakódás nem figyelhető meg.

2. Változások a neokortex principális sejtek morfológiájában élettani és patológiás hAPP expresszió mellett

2.1. A dendritfa változásának jelentősége

A dendritek a neuronok azon nyúlványai, melyeken az afferens serkentő információ a sejtet eléri. Korábbi vélekedésekkel ellentétben a dendritfa nem csupán passzívan továbbítja az információt a sejttest felé, hanem a beérkező információ feldolgozásában is szerepet játszik (Hausser et al. 2000). Jóllehet a dendritfa alakját jelentős mértékben intrinzik tényezők határozzák meg (Bray 1973, Banker and Cowan 1979), több új tanulmány bizonyítja, hogy a dendritnövekedés rendkívül dinamikusan reagál környezeti hatásokra (McAllister 2000, Scott and Luo 2001). A dendritfa felszínének nagysága egyenes arányban áll a rajta található serkentő szinapszisok számával, melyek döntő többsége a nyúlványok speciális módosulatain, a dendrittüskéken jön létre (Colonnier, 1968; Feldman, 1975; Feldman & Dowd, 1975; Müller et al. 1984). Mindezek alapján nem túlzás kijelenteni, hogy a dendritfa alakjának változása döntő jelentőséggel bír az idegsejtek működésére illetve annak jelentős változásait tükrözi.

2.2. A dendritek alakjának mennyiségi vizsgálata

A piramissejtek morfológiája, tekintettel dendritfáik alakjainak sokféleségére, nagyon heterogén (Feldman, 1984). Még ugyanazon régióban is jelentős különbségek észlelhetők aszerint, hogy azok callosalis, asszociációs vagy lokális projekcióval bíró neuronok-e (Soloway és mtsai 2002; Duan és mtsai, 2002). A transzgenikus és kontroll állatok piramissejtjeinek összehasonlításához ezért egy homogén sejtpopulációt választottunk ki, a primer szomatoszenzoros kéreg (S1) harmadik rétegének commissuralis neuronjait.

A commissuralis piramissejteket *in vivo* retrograd jelöléssel tettük láthatóvá, a pályakövető anyagot a kéréstestbe juttattuk a primer szomatoszenzoros kéregnek megfelelő craniocaudalis magasságban. A hisztokémiai reakciót vastag metszeteken (160-200 μ m) végeztük, hogy minél teljesebb képet kaphassunk a leképezendő neuronokról. A használt

pályakövető anyaggal (biotinilált dextrán amin) igen részletes kép nyerhető a feltöltött neuronokról (Reiner et al. 2000).

A sejtek leképezése egy mikroszkóppal összekapcsolt számítógéppel történt a Neurolucida™ program (MicroBrightField, Inc.) segítségével, majd a sejt digitális képét a Neuroexplorer™ programmal (MicroBrightField, Inc.) analizáltuk.

2.3. A dendritfa változásai élettani hAPP expresszió esetén a B6-Py8.9 egértörzsben

Kimutattuk, hogy kontroll állatokhoz képest a transzgenikus egerek neokortexében a principális sejtek mind bazális, mind apikális dendritfaiban változások lépnek fel. A bazális dendritfa proximális és intermedier szegmentjeinek felszíne a megnövekedett dendritátmérők miatt szignifikánsan nagyobb annak ellenére, hogy a szegmensek hossza csökkent. Az apikális dendritfa változásai hasonlóak, de jóval kisebbek, statisztikailag nem szignifikánsak. A bazális és apikális dendritfák Sholl analízise szerint a dendritsűrűség a proximális és intermedier dendritmezőkben megnövekedett, összességében a dendritfák a sejttest felé kismértékben visszahúzódtak. Mivel a dendritfelszín szorosan összefügg a szinaptikus kapcsolatok számával (Colonnier 1968, Feldman 1975, Müller et al. 1984), feltételezzük, hogy a humán APP neuronális expressziója növeli a szinapszisok számát, mégpedig a dendritfák proximális és középső régiójában, mely az afferens impulzusok effektívebb továbbítását segíti (Anderson et al. 1987, Henze et al. 1996). A sejttest és a dendritfa különböző mennyiségi jellemzőinek korrelációs analízisei nem mutattak változást, mely arra utal, hogy a neuronok alapvető geometriai jellege nem változott.

2.4. A dendritfa változásai aberráns hAPP expresszió esetén a Tg2576 egértörzsben

A részletes szegment- és Sholl analízisek azt mutatták, hogy míg a bazális dendritfa gyakorlatilag változatlan mennyiségi jellemzőkkel bír, az apikális dendritfa rövidebb és kevésbé elágazódóbb. Az apikális dendritek oldalágain a proximális dendritszakaszok átmérője megnövekedett, míg a disztális dendritszakaszoké kisebbedett. Mind a bazális, mind az apikális dendriteken a tüskesűrűség jelentősen csökkent a dendritfa egész hosszán, és ez a változás független a dendritátmértől. Az eredmények alapján feltételezzük, hogy a béta-amiloid lerakódáshoz vezető APP expresszió átfogó, a dendritfa egészére kiterjedő morfológiai változásokat okoz. Ezen megfigyeléseket újszerűnek találjuk, mert korábbi megfigyelések a plakkokon belül vagy azok közvetlen közelében hangsúlyozták a neuronok nyúlványainak degeneratív elváltozását (Irizarry et al. 1997, Knowles et al. 1998, 1999, Le et al. 2001, Tsai et al. 2004). Feltételezzük, hogy a proximális dendritszakaszok átmérőjének növekedése az apikális dendritek oldalágain az APP molekula ill. annak hasadási termékei trofikus hatásának tudható be, hiszen hasonló változásokat láttunk az 1. pontban ismertetett egértörzs vizsgálata során is. Ezzel szemben a disztális dendritszakaszok méretcsökkenése, valamint a tüskeszám radikális csökkenése feltevésünk szerint a plakklerakódást is kiváltó magas beta-amiloid szintnek tulajdonítható. Hasonlóan az élettani hAPP expresszió esetén találtakhoz nem fedeztünk fel változást a neuronok geometriájában a sejttest és a dendritfa különböző mennyiségi jellemzőinek korrelációs analízisei alapján.

3. Az idegsejtek közötti kapcsolatok változása élettani és patológiás hAPP expresszió mellett

3.1. A nagyagykéreg afferenseinek vizsgálata

A neokortikális afferensek változását a primer szomatoszenzoros kéregben vizsgáltuk, ugyanott, ahol a principális sejtek dendritanalízisét végeztük. Külön kvantifikáltuk a specifikus afferenseket - ezen belül elkülönítettük az inter- és intrahemiszférikus és thalamokortikális végződéseket -, a nemspecifikus kolinerg és katekolaminerg afferenseket, továbbá a piramissejtek periszomatikus gátló afferenseit. Az afferenseket és végződéseiket vezikuláris glutamát és GABA/glicin transzporterek, kolin acetil transzferáz és tirozin-hidroxiláz elleni immunhisztokémiai reakciókkal tettük láthatóvá. A mennyiségi analízist

félvékony metszeteken végeztük digitális kép-analízis program segítségével. A piramis sejtek efferenseit anterograd pályakövetéssel feltöltött axonokon kvantifikáltuk, az axonokon azonosított varikozitások sűrűségét állapítottuk meg. Fénymikroszkópos vizsgálatainkat elektronmikroszkópos analízissel egészítettük ki.

3.2. Az afferensek mennyiségi változásai élettani hAPP expresszió esetén a B6-Py8.9 egértörzsben

Kísérleteink kimutatták, hogy míg a talamokortikális végződések száma nem változott, az inter- és intrahemiszférikus afferensek és efferensek mennyisége megnövekedett a vizsgált neokortexben. A nonspecifikus afferensek számában is történtek változások, a kolinerg végződések száma nőtt, de a katekolaminerg végződések száma nem változott. Ugyancsak nem találtunk eltérést a piramis sejtek körüli periszomatikus gátló terminálisok számában sem.

3.2. Az afferensek mennyiségi változásai aberráns hAPP expresszió esetén a Tg2576 egértörzsben

Plakklerakódáshoz vezető mutáns hAPP expresszió mellett csökkent az inter- és intrahemiszférikus afferensek és efferensek száma, ugyanakkor a talamokortikális végződések mennyisége nem változott. A nonspecifikus afferensek mennyisége hasonló módon változott, mint a B6-Py8.9 egértörzsben, vagyis a katekolaminerg végződések száma nem változott, míg a kolinerg terminálisok száma nőtt. További eltérés, a piramis sejtek körül csökkent a gátló szinapszisok sűrűsége.

3.3. A piramis sejtek efferens kapcsolatainak vizsgálata fiziológiás és patológiás hAPP metabolizmusa esetén

Az anterograd pályakövetéssel végzett kísérletek azt mutatták, hogy a B6-Py8.9 egértörzsben a commissuralis rostokon a varikozitások sűrűsége nőtt, míg a szubkortikális kapcsolatokra példaként vizsgált corticostriatalis rostokon a varikozitások sűrűsége változatlan maradt.

Ellentétes változásokat figyeltünk meg a mutáns hAPP-t expresszáló Tg2576 egértörzsben. Mind a commissuralis mind a corticostriatalis axonokon jelentősen csökkent a varikozitások száma, mely a principális sejt efferens kapcsolatainak általános csökkenésére utal.

3.4. Kvantitatív elektronmikroszkópiai vizsgálatok

Ezekben a mennyiségi analízisekben a serkentő szinapszisok numerikus denzitását adtuk meg ún. objektív sztereológiai módszerrel („unbiased dissector method”) (Sterio, 1984). A szinapszisokat két egymást követő ultravékony metszetben kerestük ki, és csak azokat számoltuk, melyek a vizsgált képpárnak csak egyikén van jelen („reference section and look up section”). A szinapszisokat Mayhew kritériumai szerint azonosítottuk (Mayhew 1979, 1996).

A vizsgálatok a fénymikroszkóppal kapott eredményeket támasztották alá. A B6-Py8.9 egértörzsben a szinapszisok száma növekedett, míg a Tg2576 egértörzsben csökkent.

4. Az eredmények összegzése

Vizsgálataink alapján alábbi következtetéseket vontuk le.

4.1. A hAPP fiziológiás expressziója serkenti a piramis sejtek efferens és egymásközi afferens kapcsolatainak kiépítését. A kolinerg végződések megnövekedett száma annak szinaptogenezisben betöltött serkentő szerepét látszik igazolni. A megnövekedett számú afferens fogadására megnagyobbodott dendritfelszín és dendritfaarborizáció alakul ki a sejt általános alaki torzulása nélkül. Feltételezhető, hogy a beérkező afferens impulzusok továbbítása még effektívebb lesz azáltal, hogy a dendritfa változásai annak proximális és középső régiójában történnek (Anderson et al. 1987, Henze et al. 1996). A gazdagabbá vált afferentáción túl a piramis sejtek növelik efferens kapcsolataik számát. Ez a növekedés a kortikális kapcsolatokra vonatkozik, a subkortikális kapcsolatokra nem, melyből arra következtetünk, hogy mindenekelőtt a piramis sejtek egymás közötti kapcsolatai fejlődnek

tovább. Erre utal a talamokortikális kapcsolatok és a katekolaminerg kapcsolatok változatlan mennyisége is.

2. A hAPP aberráns metabolizmusa, mely plak-képződéshez vezet az agyszövetben, nemcsak ellensúlyozza, de ellentétre fordítja a fiziológias hAPP expresszió mellett megfigyelt neuronális változásokat. A neokortexben szelektíven csökken a piramis sejtek közötti kapcsolatok mennyisége, és ezt mind az afferens, mind az efferens oldalról igazoltuk. A principális sejtek és a közöttük létrejövő összeköttetések kiemelt hanyatlását több további megfigyelés is aláhúzza. Az egyik ilyen további jel, hogy a talamokortikális és katekolaminerg kapcsolatok száma az inter- és intrahemiszfériális terminálisok számával ellentétben változatlan maradt. Másik részről a piramis sejtek apikális dendritfája degeneratív jelenségeket mutat, felszíne és arborizációja csökken. Kiemelkedően körjelző változás, hogy a dendrittűskék sűrűsége, mely a bejövő serkentő kapcsolatok számát mutatja, jelentősen csökken mind a bazális, mind az apikális dendriteken. A szinapszisok pusztulása valószínűleg egy kompenzációs hatást indít be, ennek tulajdonítjuk a kolinerg afferensek megnövekedett számát, melyek serkentően próbál hatni új sejt közötti kapcsolatok kialakulására. Megfigyeltük, hogy a zsugorodott és bejövő impulzusaikban megrövidült principális sejtek periszomatikus gátló kontrollja, mennyiségét illetően, csökkent. Jelen kísérletekben az Alzheimer kórt modellező agykérgi változásokat, a piramis sejtek degeneratív változásait a kóros hAPP metabolizmus okozta megemelkedett Abeta fragmensszint és plaklerakódás idézte elő, nem a mikrotubulinfehérjék kóros összecsapzódása, hiszen ebben az egértörzsben utóbbi jelenség nem figyelhető meg (Gau et al. 2002). Ez igazolja, hogy a principális sejtek pusztulásához nem feltétlenül szükséges az intracelluláris tubulinok patológiás alakváltozása, a sejtdegenerációt a megemelkedett Abeta fragmensszint és plaklerakódás magában is képes előidézni.

Irodalom

- Anderson P, Storm J, Wheal HV. *J Physiol* 383:509-526, 1987.
Banker GA és Cowan WM. *J Comp Neurol* 187:469-493, 1979.
Bray D. *J Cell Biol* 56:702-712, 1973.
Colonnier M. *Brain Res* 9:268-287, 1968.
Duan H, Wearne SL, Morrison JH, Hof PR. *Neuroscience* 114:349-359, 2002.
Feldman ML. *Anat Rec* 181:354-355, 1975.
Feldman ML és Dowd C. *Z Anat Entwicklungsgeschich* 148:279-301, 1975.
Feldman ML. *Cerebral Cortex*, Vol. 1, pp 123-200, 1984.
Gau J, Steinhilb ML, Kao T, D'Amato CJ és mtsai. *Am J Path* 160:731-738, 2002.
Hausser M, Spruston N, Stuart GJ. *Science* 290:739-744, 2000.
Henze DA, Cameron WE, Barrionuevo G. *J Comp Neurol* 369:331-44, 1996.
Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C és mtsai. *Science* 274:99-102, 1996.
Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ és mtsai. *J Neurosci* 17:7053-7059, 1997.
Knowles RB, Gomez-Isla T, Hyman BT. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1122-1130, 1998.
Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L és mtsai. *PNAS USA* 96:5274-5279, 1999.
Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH és mtsai. *Nat Genet* 5:22-30, 1993.
Le R, Cruz L, Urbanc B, Knowles RB és mtsai. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:753-758, 2001.
Mayhew TM. *J Neurocytol* 8:21-38, 1979.
Mayhew TM. *J Neurocytol* 25:793-804, 1996.
McAllister AK. *Cereb Cortex* 10:963-973, 2000.
Müller LJ, Verwer RW, Nunes Cardozo B, Vrensen G és mtsai. *Neuroscience* 12:1071-1087, 1984.
Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y. *J Neurosci Methods* 103:23-37, 2000.
Scott EK és Luo L. *Nat Neurosci* 4:359-365, 2001.
Soloway AS, Pucak ML, Melchitzky DS, Lewis DA. *Neuroscience* 109:461-471, 2002.
Sterio DC. *J Microsc* 134:127-36, 1984.
Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB és mtsai. *Nat Neurosci* 7:1181-1183, 2004.